



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 102 10 737 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
G 01 N 21/63
G 01 J 3/457
C 12 Q 1/68

⑳ Aktenzeichen: 102 10 737.8
㉔ Anmeldetag: 12. 3. 2002
㉔③ Offenlegungstag: 20. 3. 2003

DE 102 10 737 A 1

⑥⑥ Innere Priorität:
101 41 950. 3 28. 08. 2001

⑦① Anmelder:
GNOTHIS Holding SA, Ecublens, CH

⑦④ Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦② Erfinder:
Rigler, Rudolf, St-Sulpice, CH; Thyberg, Per,
Stockholm, SE; Honegger, Adrian, Arlesheim, CH

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Einkanal-Mehrfarben-Korrelationsanalyse

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, wobei verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen in einer Probe zu jeweils verschiedenen Zeiten angeregt werden und die von den verschiedenen Spezies aus einem Messvolumen stammende Emissionsstrahlung durch einen einzigen Detektor aufgefangen wird. Weiterhin wird eine zur Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung offenbart.

DE 102 10 737 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, wobei verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen in einer Probe zu jeweils verschiedenen Zeiten angeregt werden und die von den verschiedenen Spezies aus einem Messvolumen stammende Emissionsstrahlung durch einen einzigen Detektor aufgefangen wird. Weiterhin wird eine zur Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung offenbart.

[0002] Die Verwendung der Fluoreszenz-Korrelations-spektroskopie (FCS) zum Nachweis von Analyten ist bekannt. EP-B-0 679 251 offenbart Verfahren und Vorrichtungen zur Detektion von Analyten mittels Fluoreszenzspektroskopie, wobei die Bestimmung in einem konfokalen Messvolumen durchgeführt wird, das Teil der zu untersuchenden Probe ist.

[0003] Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie kann in Verbindung mit einer sogenannten Kreuzkorrelationsanalyse durchgeführt werden, wobei zwei hinsichtlich mindestens einer optischen Eigenschaft verschiedenen Spezies von lumineszierenden Molekülen in einem konfokalen Messvolumen angeregt und das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit einer Korrelation zwischen beiden Messsignalen analysiert wird. Ein Nachteil bisher verwendeter Kreuzkorrelationsverfahren besteht jedoch darin, dass die von den verschiedenen lumineszierenden Spezies stammenden Emissionsstrahlungen durch jeweils separate Detektoren nachgewiesen werden musste.

[0004] Eine der vorliegenden Anmeldung zugrunde liegende Aufgabe bestand darin, Verfahren und Vorrichtungen zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen, insbesondere durch Mehrfarben-Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie herzustellen, die auf einfache Weise eine Bestimmung von Kreuzkorrelationen erlauben.

[0005] Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Probe umfassend lumineszierende Moleküle,
- (b) Bestrahlen der Probe mit einer optischen Anregungs- und Fokussiereinrichtung zur optischen Anregung von lumineszierenden Molekülen in mindestens einem konfokalen Messvolumen, das Teil der Probe ist, und
- (c) Auffangen und Auswerten von Emissionsstrahlung aus dem mindestens einen Messvolumen,

[0006] wobei in einem Messvolumen mehrere hinsichtlich einer optischen Eigenschaft verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen zu jeweils verschiedenen Zeiten angeregt werden und die von den verschiedenen Spezies stammende Emissionsstrahlung durch einen einzigen Detektor aufgefangen und ausgewertet wird.

[0007] Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine Einkanal-Mehrfarben-Korrelationsanalyse dar, wobei mehrere, z. B. 2, 3, 4 oder noch mehr, hinsichtlich mindestens einer optischen Eigenschaft, wie Emissionswellenlänge oder/und Lumineszenz-Abklingzeit, verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen in einem einzigen Messvolumen angeregt und die Signale auf einem einzigen Detektor ausgewertet werden können.

[0008] Hierzu werden vorzugsweise 2 oder mehr, z. B. 3, separate Lichtquellen, insbesondere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen, z. B. λ_1 , λ_2 , λ_3 , zur jeweiligen separa-

ten Anregung verschiedener Spezies verwendet. Diese separaten Lichtquellen können mittels eines oder mehrerer stellbarer optischer Schaltelemente zu jeweils verschiedenen Zeiten in das konfokale Messvolumen eingestrahlt bzw. eingekoppelt und zur Anregung der Emission darin verwendet werden. Beispiele für geeignete stellbare optische Schaltelemente sind akustooptische Modulatoren, stellbare Reflexionselemente, wie etwa piezogesteuerte Spiegel, stellbare Beugungselemente, stellbare diffraktionsoptische Elemente und Kerrzellen. Zum Nachweis der Signale wird pro Messvolumen nur ein einziger Detektor verwendet, der abwechselnd die von den verschiedenen angeregten Spezies emittierten Signale aufnimmt und durch geeignete Maßnahmen, z. B. eine digitales Kodierungssignal, definiert. An den Detektor angeschlossen sind vorzugsweise weiterhin ein Signalprozessor, eine Datenspeichereinheit und ein Korrelator.

[0009] Das vom Detektor aufgenommene Signal wird vorzugsweise mit einem der Taktfrequenz der verschiedenen Lichtquellen entsprechenden Kodierungssignal in einem Korrelator ausgewertet. Alternativ können auch energiedispersive Detektoren verwendet werden, die zwischen den einzelnen Emissionsstrahlungsarten, die von den jeweils verschieden angeregten Spezies stammen, unterscheiden können. Die Taktfrequenz, mit der die verschiedenen Lichtquellen auf das Messvolumen eingestrahlt werden, steht in Relation zu dem zu erwartenden Messsignal. So wird bei der Bestimmung von Diffusionsereignissen, wo die Diffusionszeit, z. B. im Bereich von etwa 1 ns liegt, eine Taktfrequenz mit einem erheblich geringeren Taktintervall, z. B. mit einem Taktintervall von 0,1 10 μ s (entsprechend 10 0,1 MHz), z. B. von etwa 1 μ s (entsprechend 1 MHz), eingestellt. Bei anderen Arten von Bestimmungen erfolgt eine entsprechende Einstellung der Taktzeit.

[0010] Aus dem Zeitverlauf der einzelnen, von jeweils verschiedenen lumineszierenden Spezies stammenden Emissionssignalen, z. B. μ_1 , μ_2 , μ_3 , können Autokorrelationsfunktionen (lediglich Berücksichtigung eines einzelnen Signals) sowie Kreuzkorrelationen (gemeinsame Berücksichtigung mehrerer Signale), z. B. $\mu_1 \times \mu_2$, $\mu_2 \times \mu_3$, $\mu_1 \times \mu_3$ oder $\mu_1 \times \mu_2 \times \mu_3$, berechnet werden. Es handelt sich somit um ein Multiplexverfahren, das grundsätzlich auf eine größere Anzahl von Laserfrequenzen übertragbar ist.

[0011] Durch entsprechende elektronische Hintergrundanalyse kann eine Korrelations- oder/und Koinzidenzkurve berechnet werden, bei der "korrekt" auftretende Signale von solchen Signalen unterschieden werden können, die durch unerwünschte Interferenz (Crosstalk) mehrerer Markierungsgruppen entstehen.

[0012] Um die Genauigkeit des Verfahrens zu verbessern, insbesondere um ein Übersprechen der Emissionslinien μ_1 , μ_2 , μ_3 und vor allem der Exzitationslinien λ_1 , λ_2 , λ_3 zu verringern, können dichroitische Filter oder/und Blockierungsfiler, z. B. Interferenzfilter verschiedener Ordnungen oder Notch-Filter zur Regelung der Strahlung, z. B. für eine selektive Durchlässigkeit bei bestimmten Wellenlängen, eingesetzt werden.

[0013] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst eine parallele Bestimmung von lumineszierenden Molekülen in mehreren Proben. Dabei kann das von der optischen Anregungseinrichtung ausgestrahlte Licht in multiple Lichtstrahlen bzw. Foci aufgespalten werden, die auf Messvolumina in mehreren Proben fokussiert werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Aufspaltung des ausgestrahlten Lichts durch Verwendung eines oder mehrerer diffraktiver optischer Elemente, wie in DE 101 26 083,0 beschrieben. Besonders bevorzugt wird für jede Lichtquelle

ein diffraktives optisches Element verwendet, das vor der Strahlenvereinigung in den Strahlengang angeordnet wird. **[0014]** Als diffraktive optische Elemente können beispielsweise dreidimensionale, gegebenenfalls auf einen optisch transparenten Träger aufgebrachte optische Gitter verwendet werden, welche hindurchtretendes Licht beugen und in der Objektebene durch konstruktive und destruktive Interferenz ein vorbestimmtes Beugungsmuster, d. h. eine gewünschte Anordnung multipler optischer Foci, in beliebigen Anordnungen erzeugt werden können. Die multiplen optischen Foci werden dabei günstigerweise durch Interferenzen 1. Ordnung gebildet, wobei nur geringe Lichtverluste durch Interferenzen der 0. bzw. höherer Ordnungen auftreten.

[0015] Die Herstellung geeigneter diffraktiver optischer Elemente ist beispielsweise in der Dissertation von E. Nikolaief am Chalmers Institute of Technologies (1999), in der Dissertation von M. Johansson am Chalmers Institute of Technologies (2001) sowie in der Publikation Johansson und Hard (Applied Optics 38 (1999), 1302-1310) beschrieben. Als Materialien zur Herstellung der optischen Elemente sind Kunststoffe, Glas und Verbundstoffe bzw. andere Materialien mit optischer Transparenz für eine gegebene Wellenlänge geeignet, die durch photolithographische Ätzung bearbeitet werden können.

[0016] Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft den Nachweis von in den konfokalen Messvolumina lumineszierenden Molekülen durch Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie. Das Verfahren kann grundsätzlich nach der in EP-B(0) 679 251 beschriebenen Methode durchgeführt werden. Dabei erfolgt vorzugsweise die Messung von einem oder wenigen Analytmolekülen in einem Messvolumen, wobei die Konzentration der zu bestimmenden Analytmoleküle vorzugsweise $\leq 10^{-6}$ mol/l beträgt und das Messvolumen vorzugsweise $\leq 10^{-14}$ l ist. Es werden stoffspezifische Parameter bestimmt, die durch Lumineszenzmessung an den Analytmolekülen ermittelt werden. Bei diesen Parametern kann es sich um Translationsdiffusions-Koeffizienten, Rotationsdiffusions-Koeffizienten oder/und um die Exzitationswellenlänge, die Emissionwellenlänge oder/und die Lebensdauer eines angeregten Zustandes eines lumineszierenden Moleküls oder die Kombination von einer oder mehrerer dieser Messgrößen handeln. Auf Einzelheiten zu apparativen Details wird auf die Offenbarung von EP 0 679 251 verwiesen.

[0017] Ein bevorzugtes Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass der Abstand zwischen dem Messvolumen in der Probenflüssigkeit und der Fokussieroptik der Lichtquelle ≥ 1 mm, vorzugsweise 1,5 bis 10 mm und besonders bevorzugt 2 bis 5 mm beträgt. Weiterhin ist bevorzugt, dass zwischen dem die Probenflüssigkeit enthaltenden Träger und der optischen Fokussiereinrichtung ein Gasphasenbereich angeordnet ist, der Luft, Schutzgas oder Vakuum enthalten kann. Verfahren und Vorrichtungen zur Durchführung von FCS mit großem Abstand zwischen Fokussieroptik und konfokalem Messvolumen sind in DE 101 11 420.6 beschrieben. Für gewisse Anwendungen kann jedoch selbstverständlich auch ein geringerer Abstand zwischen Fokussieroptik und Messvolumen von < 1 mm gewählt werden. Ebenso kann auch ein unmittelbarer Kontakt zwischen Probe und Fokussieroptik, z. B. durch Verwendung einer Immersionsflüssigkeit, bestehen.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich zur Durchführung beliebiger Bestimmungsverfahren geeignet. Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft die Bestimmung eines Analyten in einer Probe, z. B. für diagnostische Anwendungen oder für ein Screening zur Identifizierung von Wirkstoffen, die mit einer Zielsubstanz wechselwirken.

Hierzu werden eine oder mehrere Analyt-bindende Substanzen der Probe zugegeben, die eine durch Lumineszenzmessung nachweisbare Markierungsgruppe, insbesondere Fluoreszenz-Markierungsgruppe tragen. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst in diesem Fall vorzugsweise eine Bestimmung der Bindung der Markierungssubstanz an den nachzuweisenden Analyten. Dieser Nachweis kann beispielsweise durch Mehrfarben-Kreuzkorrelationsbestimmung erfolgen, wobei mindestens zwei unterschiedliche Markierungen, insbesondere Fluoreszenzmarkierungen, eingesetzt werden, deren korreliertes Signal innerhalb des Messvolumens bestimmt wird. Diese Kreuzkorrelationsbestimmung ist beispielsweise bei Schwille et al. (Biophys. J. 72 (1997), 1878-1886) und Rigler et al. (J. Biotechnol. 63 (1998), 97-109) beschrieben.

[0019] Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen, z. B. Nukleinsäuren, Proteinen oder anderen, in lebenden Organismen, insbesondere in Säugern wie dem Menschen vorkommenden, Analytmolekülen. Darüber hinaus können auch Analyten nachgewiesen werden, die in vitro aus biologischen Proben erzeugt worden sind, z. B. cDNA-Moleküle, die durch Reverse Transkription aus mRNA hergestellt worden sind, oder Proteine, die durch in vitro Translation aus mRNA bzw. aus DNA hergestellt worden sind. Weiterhin eignet sich das Verfahren zum Nachweis von Analyten, die als Elemente einer Bibliothek vorliegen und vorbestimmte Charakteristika, z. B. Bindung an das Nachweisreagenz, zeigen sollen. Beispiele solcher Bibliotheken sind Phagenbibliotheken oder ribosomale Bibliotheken.

[0020] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Bestimmung eine Nukleinsäurehybridisierung, wobei eine oder mehrere lumineszenzmarkierte Sonden an eine Zielnukleinsäure als Analyten binden. Derartige Hybridisierungsverfahren können beispielsweise zur Analyse der Genexpression, z. B. zur Ermittlung eines Genexpressionsprofils, zur Analyse von Mutationen, z. B. Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich jedoch auch zur Bestimmung enzymatischer Reaktionen oder/und zur Bestimmung von Nukleinsäureamplifikationen, insbesondere in einem Thermocycling-Prozess. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäure-Polymorphismen sind in DE 100 56 226.4 und DE 100 65 631.5 beschrieben. Dabei wird besonders bevorzugt eine Zwei- oder Mehrfarben-Kreuzkorrelationsbestimmung durchgeführt.

[0021] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Bestimmung den Nachweis einer Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkung, wobei als Proteinliganden z. B. niedermolekulare Wirkstoffe, Peptide, Nukleinsäuren etc. eingesetzt werden können. Auch für derartige Bestimmungen wird bevorzugt eine Zwei- oder Mehrfarbenkorrelationsmessung durchgeführt. **[0022]** In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform können sogenannte "Molecular Beacon" Sonden oder Primer eingesetzt werden, die wenn sie in freier Form vorliegen ein hinsichtlich der Lumineszenzintensität oder/und -abklingzeit verschiedenes Messsignal als in gebundenem Zustand ergeben.

[0023] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Selektion von Partikeln in einer Substanzbibliothek, wobei ein Partikel mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population, umfassend eine Vielzahl von unterschiedlichen Partikeln, selektioniert wird. Hierzu wird vorzugsweise eine Population von unterschiedlichen Partikeln bereitgestellt, Partikel, die eine vorbestimmte Eigenschaft aufweisen, markiert, die Partikel in einem Mikrokanal durch ein Detektionselement, umfassend

multiple konfokale Volumenelemente, geleitet, um zwischen markierten und nichtmarkierten Partikeln zu unterscheiden und markierte Partikel abgetrennt. Die Schritte des Leitiens und des Abtrennens werden vorzugsweise mindestens einmal wiederholt, wobei die Konzentration der Partikel in einem nachfolgenden Zyklus gegenüber einem vorhergehenden Zyklus vorzugsweise um mindestens den Faktor 104 verringert wird. Die Partikel können beispielsweise aus Zellen, Teilen von Zelloberflächen, Zellorganellen, Viren, Nukleinsäuren, Proteinen und niedermolekularen Substanzen ausgewählt werden. Das Verfahren eignet sich auch zur Selektion von Partikeln aus einer kombinatorischen Bibliothek, die genetische Packungen wie Phagen, Zellen, Sporen oder Ribosomen enthalten kann. Die Partikelpopulation enthält vorzugsweise mehr als 10^6 und besonders bevorzugt mehr als 10^{10} unterschiedliche Partikel. Die Partikel werden vorzugsweise mit einer Lumineszenzmarkierungsgruppe markiert.

[0024] Noch eine weitere Ausführungsform umfasst die Durchführung einer Sequenzanalyse von Polymeren, insbesondere Biopolymeren, wobei lumineszierende Fragmente eines in der Probe vorhandenen Analyten bestimmt werden. Diese Ausführungsform ist insbesondere zur Durchführung einer Nukleinsäure-Sequenzierung geeignet. Hierzu wird vorzugsweise ein Trägerpartikel mit einem darauf immobilisierten Nukleinsäuremolekül bereitgestellt, wobei im Wesentlichen alle Nukleotidbausteine von mindestens einem Basentyp in mindestens einem Strang des Nukleinsäuremoleküls eine Fluoreszenzmarkierung tragen. Das Trägerpartikel wird in eine Sequenziervorrichtung umfassend einen Mikrokanal eingebracht, dort, z. B. mit einem IR-Einfanglaser festgehalten und, z. B. durch Behandlung mit einer Exonuklease, fortschreitend einzelne Nukleotidbausteine von dem immobilisierten Nukleinsäuremolekül abgespalten. Die abgespaltenen Nukleotidbausteine werden dann durch einen Mikrokanal, vorzugsweise mittels eines hydrodynamischen Flusses, geleitet und dort in konfokalen Volumenelementen die Basenfolge des Nukleinsäuremoleküls aufgrund der Abfolge der abgespaltenen Nukleotidbausteine bestimmt.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt eine Aufspaltung der von den Lichtquellen stammenden Lichtstrahlen in mehrere optische Foci. Vorzugsweise wird der Lichtstrahl in 2-32, insbesondere in 4-16 optische Foci aufgespalten. Durch Verwendung einer geeigneten Fokussieroptik werden aus diesen optischen Foci konfokale Volumenelemente in der Probe abgebildet. Die konfokalen Volumenelemente haben günstigerweise eine Größe von 10^{18} bis 10^{19} l, vorzugsweise von 10^{18} bis 10^{12} l und besonders bevorzugt von 10^{16} bis 10^{14} l.

[0026] Zum Auflängen von Strahlung, insbesondere Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen, wird vorzugsweise jeweils ein separater Detektor pro Volumeneinheit oder eine ortsauflösende Detektormatrix, z. B. eine Avalanche-Fotodiodenmatrix oder eine elektronische Detektormatrix, z. B. eine CCD-Kamera, verwendet.

[0027] Die Aufspaltung des Lichtstrahls in mehrere optische Foci erlaubt die parallele Bestimmung in separaten konfokalen Volumenelementen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind diese konfokalen Volumenelemente in jeweils separaten Behältnissen eines Trägers, vorzugsweise einer Mikrostruktur, vorgesehen.

[0028] Das Volumen dieser Behältnisse liegt vorzugsweise im Bereich von $\leq 10^{-6}$ l und besonders bevorzugt $\leq 10^{-8}$ l bis 10^{-2} l. So kann der Träger eine Mikrowellstruktur mit mehreren Vertiefungen zur Aufnahme von Probenflüssigkeit umfassen, die beispielsweise einen Durchmesser zwischen 10 und 1000 μ m aufweisen. Geeignete Mikrostruktu-

ren sind z. B. in DE 100 23 421.6 und DE 100 65 632.3 beschrieben. Diese Mikrostrukturen können beispielsweise zur Bestimmung einer Nukleinsäure-Hybridisierung in Lösung eingesetzt werden. Weiterhin umfasst der Träger vorzugsweise mindestens ein Temperatur-Steuerungselement, z. B. ein Peltier-Element, welches eine Temperaturregelung des Trägers oder/und einzelner Probenbehältnisse darin ermöglicht.

[0029] Der für das Verfahren verwendete Träger ist zweckmäßigerweise so ausgestaltet, dass er eine optische Detektion der Probe ermöglicht. Vorzugsweise wird daher ein zumindest im Bereich der Probenbehältnisse optisch transparenter Träger verwendet. Der Träger kann dabei entweder vollständig optisch transparent sein oder eine optisch transparente Basis und eine optisch undurchlässige Deckschicht mit Aussparungen in den Probenbehältnissen enthalten. Geeignete Materialien für Träger sind beispielsweise Verbundstoffträger aus Metall (z. B. Silicium für die Deckschicht) und Glas (für die Basis). Derartige Träger können beispielsweise durch Aufbringen einer Metallschicht mit vorgegebenen Aussparungen für die Probenbehältnisse auf das Glas erzeugt werden. Alternativ können Plastikträger, z. B. aus Polystyrol oder Polymeren auf Acrylat- oder Methacrylatbasis eingesetzt werden. Weiterhin ist bevorzugt, dass der Träger eine Abdeckung für die Probenbehältnisse aufweist, um während der Messung ein geschlossenes und von der Umgebung im Wesentlichen isoliertes System bereitzustellen.

[0030] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird ein Träger verwendet, der ein Linsenelement enthält, das im Strahlengang zwischen Messvolumen und Lichtquelle bzw. Detektor der optischen Vorrichtung angeordnet ist. Beispielsweise kann das Linsenelement am Boden einer Mikrowellstruktur angebracht sein. Ein derartiges Linsenelement lässt sich beispielsweise durch Erhitzen und Formen eines Photoresists unter Verwendung einer Master-Form, z. B. aus Metall wie Silicium, erzeugen und dann auf den Träger aufgebracht werden. Alternativ können z. B. bei Verwendung von Trägern aus Vollplastikstruktur die Linsenelemente in den Träger integriert, z. B. während der Herstellung durch Spritzgießen erzeugt werden. Durch Verwendung eines Linsenelements, vorzugsweise eines konvexen Linsenelements, kann die numerische Apertur der optischen Messanordnung vergrößert werden. Diese numerische Apertur liegt vorzugsweise im Bereich von 0,5 bis 1,2.

[0031] Der Träger ist weiterhin vorzugsweise mit einem transparenten Antireflexionsüberzug beschichtet, um einen höheren Brechungsindex zu erzeugen. Als Antireflexionsüberzüge können beispielsweise transparente Oxide oder Nitride eingesetzt werden. Antireflexionsbeschichtungen werden vorzugsweise auch auf der Optik verwendet.

[0032] Weiterhin können im Träger elektrische Felder, insbesondere im Bereich der Probenbehältnisse erzeugt werden, um eine Konzentrierung der zu bestimmenden Analyten im Messvolumen zu erreichen. Beispiele für Elektroden, die zur Erzeugung solcher elektrischen Felder geeignet sind, sind z. B. in DE 101 03 304.4 beschrieben.

[0033] Das zu bestimmende Molekül kann insbesondere bei einer Bestimmung im Mikrowellformat oder bei der Einzelmolekülsequenzierung an ein Trägerpartikel gebunden sein. Das Trägerpartikel hat eine Größe, die eine Bewegung in Mikrokanälen und das Festhalten an einer gewünschten Position innerhalb einer Sequenzierungsvorrichtung ermöglicht. Die Partikelgröße liegt vorzugsweise im Bereich von 0,5-10 μ m und besonders bevorzugt von 1-3 μ m. Beispiele für geeignete Materialien von Trägerpartikeln sind Kunststoffe, wie Polystyrol, Glas, Quarz, Metalle oder Halbleiterteile, wie Silicium, Metalloxide, wie Siliciumdioxid, oder

Verbundmaterialien, die mehrere der zuvor genannten Komponenten enthalten. Besonders bevorzugt werden optisch transparente Trägerpartikel, beispielsweise aus Kunststoffen oder Partikel mit einem Kunststoffkern und einer Siliciumdioxidhülle eingesetzt.

[0034] Nukleinsäuremoleküle werden vorzugsweise über ihr 5'-Ende auf dem Trägerpartikel immobilisiert, z. B. durch kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkung. Besonders bevorzugt erfolgt die Bindung von Polynukleotiden an den Träger durch hochaffine Wechselwirkungen zwischen den Partnern eines spezifischen Bindepaares, z. B. Biotin/Streptavidin oder Avidin etc. Alternativ können Nukleinsäuremoleküle auch adsorptiv oder kovalent an den Träger gebunden werden.

[0035] Vorzugsweise verwendet man Trägerpartikel, an die nur ein einziges Nukleinsäuremolekül gebunden ist. Derartige Trägerpartikel können dadurch erzeugt werden, dass die zur Bestimmung vorgesehenen Nukleinsäuremoleküle in einem molaren Verhältnis von vorzugsweise 1 : 5 bis 1 : 20, z. B. 1 : 10, mit den Trägerpartikeln unter Bedingungen in Kontakt gebracht werden, bei denen eine Immobilisierung der Nukleinsäuremoleküle an den Träger stattfindet.

[0036] Die an einen Träger gebundenen Nukleinsäuremoleküle, z. B. DNA-Moleküle oder RNA-Moleküle, können in einzelsträngiger Form oder doppelsträngiger Form vorliegen. Vorzugsweise liegen die Nukleinsäuremoleküle in einzelsträngiger Form vor. Beim Einsatz für die Sequenzierung tragen im Wesentlichen alle, z. B. mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95% aller Nukleotidbausteine von mindestens einem Basentyp, eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe. Es können auch im Wesentlichen alle Nukleotidbausteine von mindestens 2 Basentypen, beispielsweise 2, 3 oder 4 Basentypen, eine Fluoreszenzmarkierung tragen, wobei jeder Basentyp günstigerweise eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungsgruppe enthält. Derart markierte Nukleinsäuren können durch enzymatische Primerextension an einer Nukleinsäurematrize unter Verwendung einer geeigneten Polymerase, z. B. einer thermostabilen DNA-Polymerase, erzeugt werden. Eine genaue Beschreibung dieses Verfahrens findet sich in DE 100 31 840.1 und DE 100 65 626.9 sowie den dort angegebenen Literaturzitaten.

[0037] Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen, insbesondere zur Durchführung eines Verfahrens wie zuvor beschrieben, umfassend

(a) einen Träger zur Aufnahme einer Probe, die mehrere verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen enthält,

(b) eine optische Anregungs- und Fokussiereinrichtung, umfassend mehrere separate Lichtquellen, und ein stellbares optisches Schaltelement zur Einkopplung der separaten Lichtquellen zu verschiedenen Zeiten auf ein konfokales Messvolumen, das Teil der Probe ist, und

(c) eine optische Detektionseinrichtung, umfassend jeweils einen einzigen Detektor pro Messvolumen zum Nachweis von Lumineszenz.

[0038] Der Träger ist vorzugsweise eine Mikrostruktur mit mehreren, vorzugsweise mindestens 10, besonders bevorzugt mindestens 102 Behältnissen zur Aufnahme einer Probenflüssigkeit, wobei die Probenflüssigkeit in den separaten Behältnissen aus einer oder mehreren Quellen stammen kann. Das Einbringen der Probenflüssigkeit in die Behältnisse des Trägers kann z. B. mittels einer piezoelektrischen Flüssigkeitsabgabe-Vorrichtung erfolgen.

[0039] Die Behältnisse des Trägers sind so ausgestaltet, dass sie eine Bindung des Nachweisreagenz mit dem Analyten in Lösung ermöglichen. Vorzugsweise handelt es sich bei den Behältnissen um Vertiefungen in der Trägeroberfläche, wobei diese Vertiefungen grundsätzlich eine beliebige Form aufweisen können, z. B. kreisförmig, quadratisch, rautenförmig etc. Der Träger kann auch 103 oder mehr separate Behältnisse umfassen.

[0040] Alternativ kann der Träger auch eine Mikrokanalstruktur mit einem oder mehreren Mikrokanälen enthalten, die insbesondere für ein Einzelmolekül-Sequenzierungsverfahren, wie in DE 100 31 840.1 und DE 100 65 626.9 beschrieben, oder für ein Partikel-Selektionsverfahren, wie in DE 100 31 028.1 beschrieben, geeignet sind.

[0041] Die optische Anregungs- und Fokussiereinrichtung umfasst mehrere stark fokussierte Lichtquellen, vorzugsweise Laserstrahlen, die mittels entsprechender optischer Einrichtungen auf das Messvolumen in der Probenflüssigkeit fokussiert werden. Die einzelnen Laserstrahlen werden mit stellbaren optischen Schaltelementen zu jeweils verschiedenen Zeiten in einem vorgegebenen Zeittakt auf das Messvolumen fokussiert.

[0042] Weiterhin enthält die optische Einrichtung vorzugsweise dichroitische Filter oder/und Blockierungsfiler sowie zur Aufspaltung der Laserstrahlen in multiple Foci ein oder mehrere diffraktive optische Elemente. Die diffraktiven optischen Elemente können vor oder/und nach der Vereinigung der unterschiedlichen Laserstrahlen angeordnet werden. Vorzugsweise wird je ein diffraktives optisches Element für jeden Laser vor der Strahlenvereinigung verwendet.

[0043] Die Detektionseinrichtung kann beispielsweise einen lasergekoppelten Avalanche-Photodiodendetektor oder einen elektronischen Detektor enthalten. Es können jedoch auch Anregungs- oder/und Detektions-Matrices, bestehend aus einer Punktmatrix von Laserpunkten, erzeugt durch eine Diffraktionsoptik oder einen Quanten-Well-Laser sowie einer Detektormatrix, erzeugt durch eine Avalanche-Photodiodenmatrix oder eine elektronische Detektormatrix, z. B. eine CCD-Kamera, verwendet werden.

[0044] Der Träger kann in vorgefertigter Form bereit gestellt werden, wobei in mehrere separate Behältnisse des Trägers lumineszenzmarkierte Nachweisreagenzien, vorzugsweise lumineszenzmarkierte Hybridisierungs sonden bzw. -primer eingefüllt werden. Anschließend wird der die Nachweisreagenzien enthaltende Träger günstigerweise getrocknet.

[0045] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein vorgefertigter Träger bereitgestellt, der eine Vielzahl von separaten, z. B. 100 Behältnissen enthält, in die jeweils unterschiedliche Nachweisreagenzien, z. B. Reagenzien zum Nachweis einer Nukleinsäurehybridisierung wie Primer oder/und Sonden eingefüllt vorliegen. Dieser Träger kann dann mit einer aus einem zu untersuchenden Organismus, z. B. einem menschlichen Patienten, stammenden Probe gefüllt werden, so dass in den jeweiligen Behältnissen unterschiedliche Analyten aus einer einzigen Probe bestimmt werden. Derartige Träger können beispielsweise zur Erstellung eines Genexpressionsprofils, z. B. für die Diagnostik von Krankheiten, oder zur Bestimmung von Nukleinsäurepolymorphismen, z. B. zum Nachweis einer bestimmten genetischen Prädisposition, verwendet werden.

[0046] Weiterhin soll die Erfindung durch die beiliegenden Figuren erläutert werden.

[0047] Fig. 1 zeigt die schematische Darstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Drei Lichtquellen, z. B. Laser (1, 2, 3) mit Wellenlängen λ_1 , λ_2 und λ_3 , werden mittels geeigneter optischer Schaltelemente,

z. B. akustooptischen Modulatoren, verbunden, um ein Einkoppeln der einzelnen Laserstrahlen über einen vorgegebenen Zeittakt in den Strahlengang zu ermöglichen. Der Laserstrahl, der im vorgegebenen Zeittakt zwischen den Wellenlängen, λ_1 , λ_2 und λ_3 alterniert, trifft auf einen dichroitischen Filter (6), der ihn über ein Fokussierobjektiv (8) auf ein konfokales Messvolumen in der Probe (10) lenkt. Von lumineszierenden Molekülen in der Probe (10) ausgehende Emissionsstrahlung wird durch den dichroitischen Filter (6) und einen BlockierungsfILTER (12) und anschließend über eine Lochblende (14) in einen Detektor (16) mit Signalprozessor, Datenspeicherung und Korrelator geleitet.

[0048] Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung des zeitabhängigen Signalfusses $I(t)$ am Detektor. Das aus der Emissionsstrahlung μ_1 , μ_2 , μ_3 von in der Probe befindlichen lumineszierenden Molekülen stammende Signal wird vom Detektor aufgezeichnet und mit einem Kodierungssignal für den jeweiligen Zeittakt der Wellenlängen λ_1 , λ_2 und λ_3 versehen. Aus den Zeitverläufen von μ_1 , μ_2 und μ_3 können die entsprechenden Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen berechnet werden.

[0049] Fig. 3A zeigt die von der Wellenlänge λ abhängige Reflexion (R) bzw. Transmission (T) des dichroitischen Filters (6) gemäß Fig. 1. Die Transmission ist bei den Anregungswellenlängen λ_1 , λ_2 und λ_3 minimal.

[0050] Fig. 3B zeigt die wellenlängenabhängige Transmission (T) eines Blockierungsfilters (12) gemäß Fig. 1. Die Transmission ist im Bereich der Anregungswellenlängen λ_1 , λ_2 und λ_3 minimal, im Bereich der Emissionswellenlängen μ_1 , μ_2 und μ_3 (nicht gezeigt) jedoch maximal.

[0051] Fig. 4 zeigt die schematische Darstellung einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. 3 Laser (21, 22, 23) werden mittels optischer Schaltelemente (24a, 24b) in einem vorgegebenen Zeittakt in den Strahlengang eingekoppelt. Der Laserstrahl tritt durch ein diffraktives optisches Element (26) hindurch und wird dort in eine Vielzahl, z. B. 9 optischer Foci (im Querschnitt gezeigt), mit einer im Zeittakt wechselnden Wellenlänge λ_1 , λ_2 und λ_3 aufgespalten. Der aufgespaltene Lichtstrahl wird über einen dichroitischen Spiegel (28) und ein, gegebenenfalls aus mehreren Subelementen, bestehendes Fokussierobjektiv (10) auf eine Probenmatrix (12) geleitet. Diese Probenmatrix besteht z. B. entsprechend der Matrix der multiplen optischen Foci aus mehreren separaten Proben, die jeweils ein Messvolumen enthalten. Von den Messvolumina der Probenmatrix (32) stammende Emissionsstrahlung wird durch den dichroitischen Filter (28) und einen BlockierungsfILTER (34) auf eine Detektormatrix (36) gelenkt. Die Matrix von Emissionsstrahlen mit einer Wellenlänge μ_1 , μ_2 , μ_3 abhängig vom Zeittakt und den in der Probe angeregten Molekülen ist im Querschnitt gezeigt. In der Detektormatrix (36) werden die aus den einzelnen Messvolumina stammenden Signale in separaten Detektoren aufgefangen und ausgewertet.

[0052] Fig. 5 zeigt eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform. Dabei ist in Abweichung zu der in Fig. 4 gezeigten Anordnung direkt nach jedem Laser (31, 32, 33) jeweils ein diffraktives optisches Element (34, 35, 36) angeordnet. Somit kann jeder Laserstrahl in multiple optische Foci aufgespalten werden, bevor die Strahlenvereinigung mittels optischer Schaltelemente (37a, 37b) erfolgt. Ansonsten wird die Bestimmung gemäß Fig. 4 durchgeführt.

[0053] Die Ausführungsformen gemäß den Fig. 4 und 5 eignen sich für eine Einkanal-Multiplex-Mehrfarbenkorrelationsbestimmung.

[0054] Es wurde eine Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsbestimmung von 2 Markierungsgruppen in einer Probe mit 2 Laserstrahlen an dem Gerät Confocor 2 (Zeiss) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte derart, dass eine zeitlich alternierende Änderung der Wellenlänge des Anregungslichts simuliert wurde. Die Wechselfrequenz war 1 MHz, d. h. die von einer ersten Markierungsgruppe stammende Fluoreszenz wurde auf 0 für ein Zeitsegment von 1 μ s gesetzt und die von der zweiten Markierungsgruppe stammende Fluoreszenz wurde auf 0 für das nächste Zeitsegment von 1 μ s gesetzt. Folglich war die Frequenz für einen kompletten Zyklus 0,5 MHz (entsprechend einer Zeitdauer von 2 μ s).

[0055] Für eine Zeitdauer von 1 s wurden 200 Mio. Datenpunkte aufgezeichnet. Pro Zeitsegment von 1 μ s wurden daher 20 Datenpunkte aufgezeichnet. Um eine Verzögerung zu simulieren, die durch einen Wellenlängenwechsel entstehen könnte, wurden zusätzlich 2 bzw. 10 Datenpunkte pro Zeitsegment auf 0 gesetzt (entsprechend einer Verzögerung von 100 ns bzw. 500 ns). Die Berechnung der Kreuzkorrelation erfolgte auf Basis der Rohdaten des Geräts.

[0056] Es wurde gefunden, dass trotz schneller wiederholter Änderung der Wellenlänge des Anregungslichts eine Auswertung der Kreuzkorrelationsfunktion möglich ist. Insbesondere bei einer Verzögerungsdauer von 200 μ s (entsprechend Kreuzkorrelationskanälen von 76 und höher) waren keine signifikanten Unterschiede zu einer Standardauswertung zu erkennen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Probe, umfassend lumineszierende Moleküle,
- (b) Bestrahlen der Probe mit einer optischen Anregungs- und Fokussiereinrichtung zur optischen Anregung von lumineszierenden Molekülen in mindestens einem konfokalen Messvolumen, das Teil der Probe ist, und
- (c) Auffangen und Auswerten von Emissionsstrahlung aus dem mindestens einem Messvolumen,

dadurch gekennzeichnet,

dass in einem Messvolumen mehrere hinsichtlich mindestens einer optischen Eigenschaft verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen zu jeweils verschiedenen Zeiten angeregt werden und die von den verschiedenen Spezies stammende Emissionsstrahlung durch einen einzigen Detektor aufgefangen und ausgewertet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass 2, 3 oder 4 hinsichtlich der optischen Eigenschaften verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen angeregt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Anregungseinrichtung mehrere separate Lichtquellen, insbesondere Laser, zur jeweiligen Anregung verschiedener Spezies in einem Messvolumen umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die separaten Lichtquellen durch ein stellbares optisches Schaltelement zu jeweils verschiedenen Zeiten in den Strahlengang eingekoppelt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,

net, dass das stellbare optische Schaltelement aus akustooptischen Modulatoren, Reflexionselementen, Beugungselementen, diffraktiven optischen Elementen und Kerrzellen ausgewählt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kreuzkorrelation von mindestens 2 der angeregten lumineszierenden Spezies bestimmt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die angeregten lumineszierenden Spezies sich in mindestens einer optischen Eigenschaft, ausgewählt aus Emissionswellenlänge und Lumineszenz-Abklingzeit, unterscheiden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die separate Auswertung der von verschiedenen Spezies stammenden Emissionsstrahlungen die Einstellung eines Taktsignals auf dem Detektor umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Frequenz des Taktsignals im Bereich von 10 0,1 MHz einstellt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die separate Auswertung der von verschiedenen Spezies stammenden Emissionsstrahlungen die Verwendung eines energiedispersiven Detektors umfasst.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das auf das Messvolumen eingestrahlte Anregungslicht oder/und das vom Messvolumen abgestrahlte Emissionslicht optisch gefiltert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man dichroitische Filter oder/und BlockierungsfILTER zur optischen Filterung verwendet.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man eine elektronische Hintergrundanalyse durchführt, um Signale herauszufiltern, die durch unerwünschte Interferenz mehrerer Spezies von lumineszierenden Molekülen entstehen.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger mehrere separate Behältnisse zur Aufnahme von Proben enthält.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine Mikrowellstruktur mit mehreren Vertiefungen umfasst, die vorzugsweise einen Durchmesser zwischen 10 und 1000 µm aufweisen.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man eine parallele Bestimmung von lumineszierenden Molekülen in mehreren Messvolumina, insbesondere aus mehreren Proben durchführt.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das von der optischen Anregungseinrichtung ausgestrahlte Licht in multiple Foci aufgespalten wird, die auf jeweils verschiedene Messvolumina fokussiert werden.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufspaltung des ausgestrahlten Lichts durch Verwendung eines oder mehrerer diffraktiver optischer Elemente erfolgt.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass für jede Lichtquelle ein separates diffraktives optisches Element verwendet wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass man als diffraktives optisches Ele-

ment ein dreidimensionales, gegebenenfalls auf einen optisch transparenten Träger aufgebrachte optische Gitter verwendet, das hindurchtretendes Licht beugt und ein vorbestimmtes Beugungsmuster, umfassend multiple optische Foci, erzeugt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass zum parallelen Auffangen von Emissionsstrahlung aus mehreren Messvolumina eine Detektionsmatrix, umfassend mehrere Detektoren, verwendet wird, wobei ein Detektor jeweils für ein Messvolumen vorgesehen ist.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand zwischen dem Messvolumen und der Fokussieroptik ≥ 1 mm beträgt.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand zwischen der Fokussieroptik 1,5 10 mm und besonders bevorzugt 2 5 mm beträgt.

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe von der Lichtquelle und insbesondere von der Fokussieroptik thermisch isoliert ist.

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bestimmung eines in der Probe vorhandenen Analyten.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Nukleinsäure-Analyten bestimmt.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung umfasst:

- (a) eine Mutationsanalyse bei Nukleinsäuren,
- (b) eine Genexpressionsanalyse,
- (c) eine Nukleinsäure-Sequenzierung oder
- (d) eine Partikel-Selektion.

28. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen, insbesondere zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27, umfassend

- (a) einen Träger zur Aufnahme einer Probe, die mehrere verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen enthält,
- (b) eine optische Anregungs- und Fokussiereinrichtung, umfassend mehrere separate Lichtquellen, ein stellbares optisches Schaltelement zur Einkopplung der separaten Lichtquellen zu verschiedenen Zeiten auf ein konfokales Messvolumen, das Teil der Probe ist, und
- (c) eine optische Detektionseinrichtung, umfassend jeweils einen einzigen Detektor pro Messvolumen zum Nachweis von Lumineszenz.

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass sie weiterhin ein oder mehrere diffraktionsoptische Elemente zur Aufspaltung des Anregungslichts in multiple Foci enthält.

30. Vorrichtung nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, dass für jede Lichtquelle ein separates diffraktives optisches Element vorgesehen ist.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass sie weiterhin eine Detektormatrix, umfassend mehrere Detektoren, zum parallelen Auffangen von Emissionsstrahlung aus mehreren Messvolumina enthält, wobei ein Detektor für jeweils ein Messvolumen vorgesehen ist.

32. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 31 für die Fluoreszenz-Korrelations-

spektroskopie.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

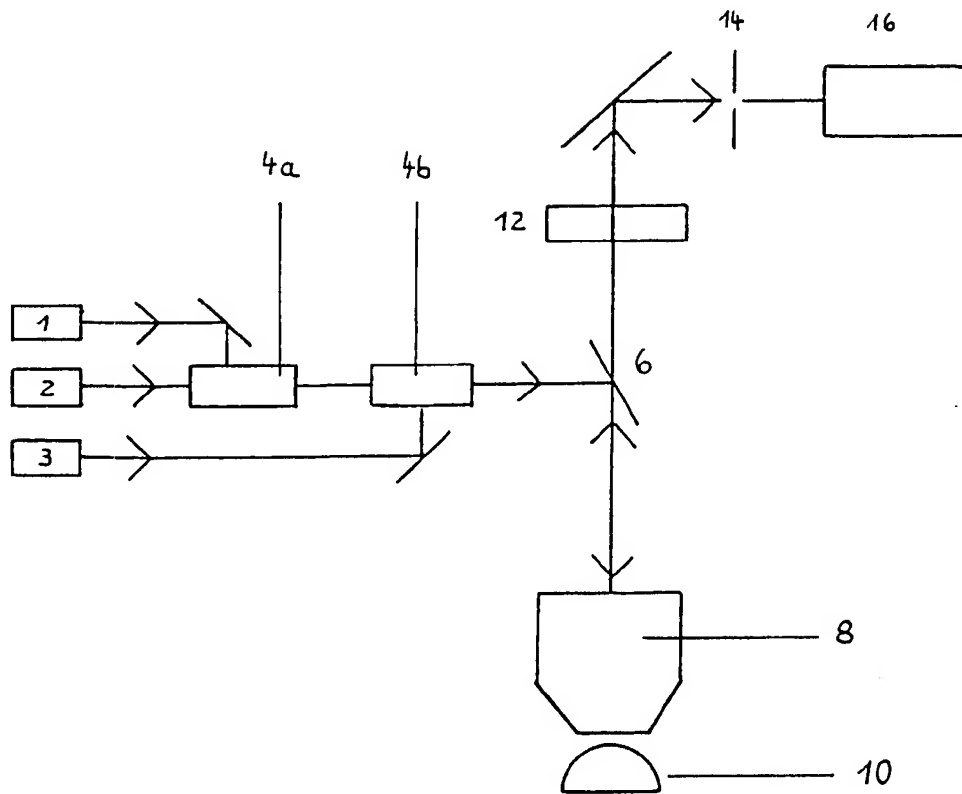
55

60

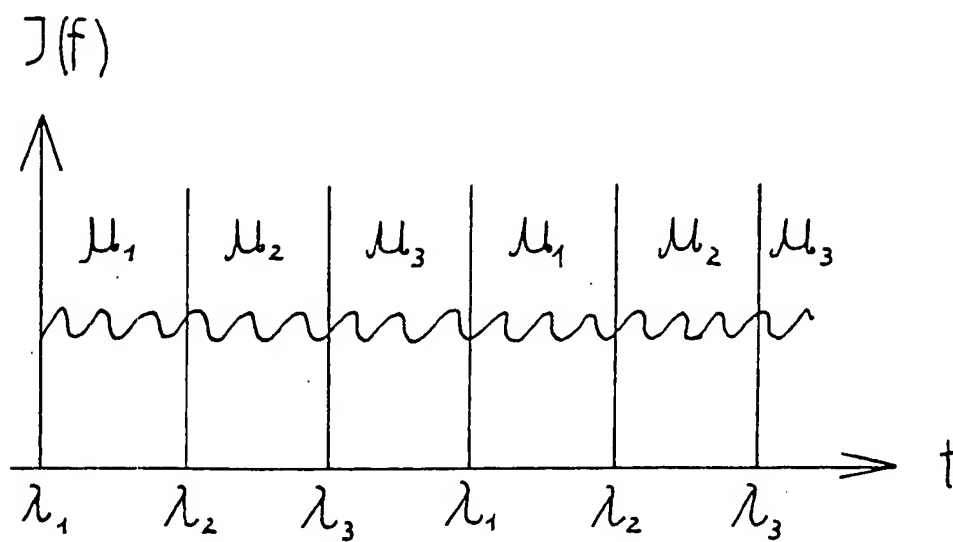
65

- Leerseite -

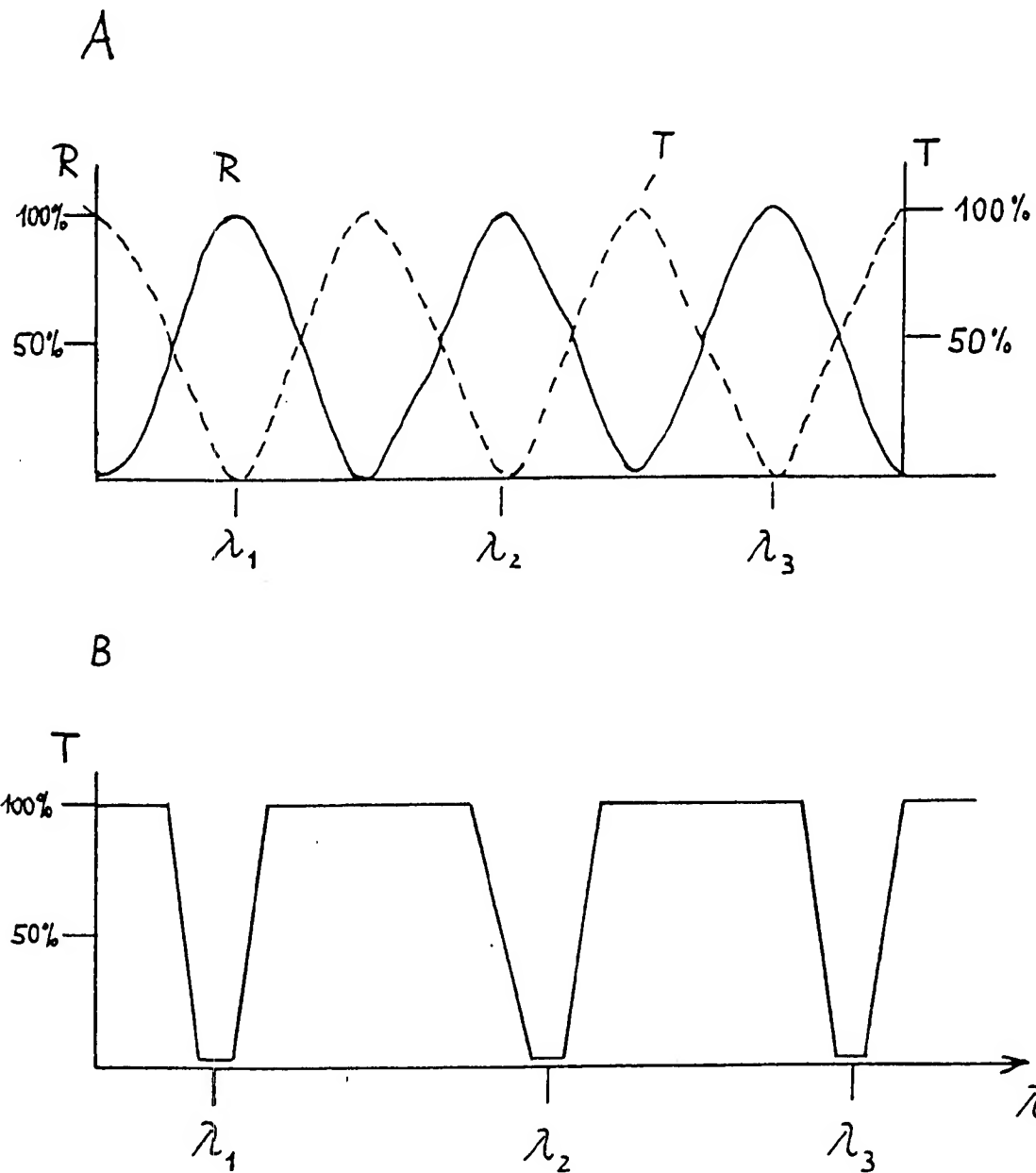
Figur 1



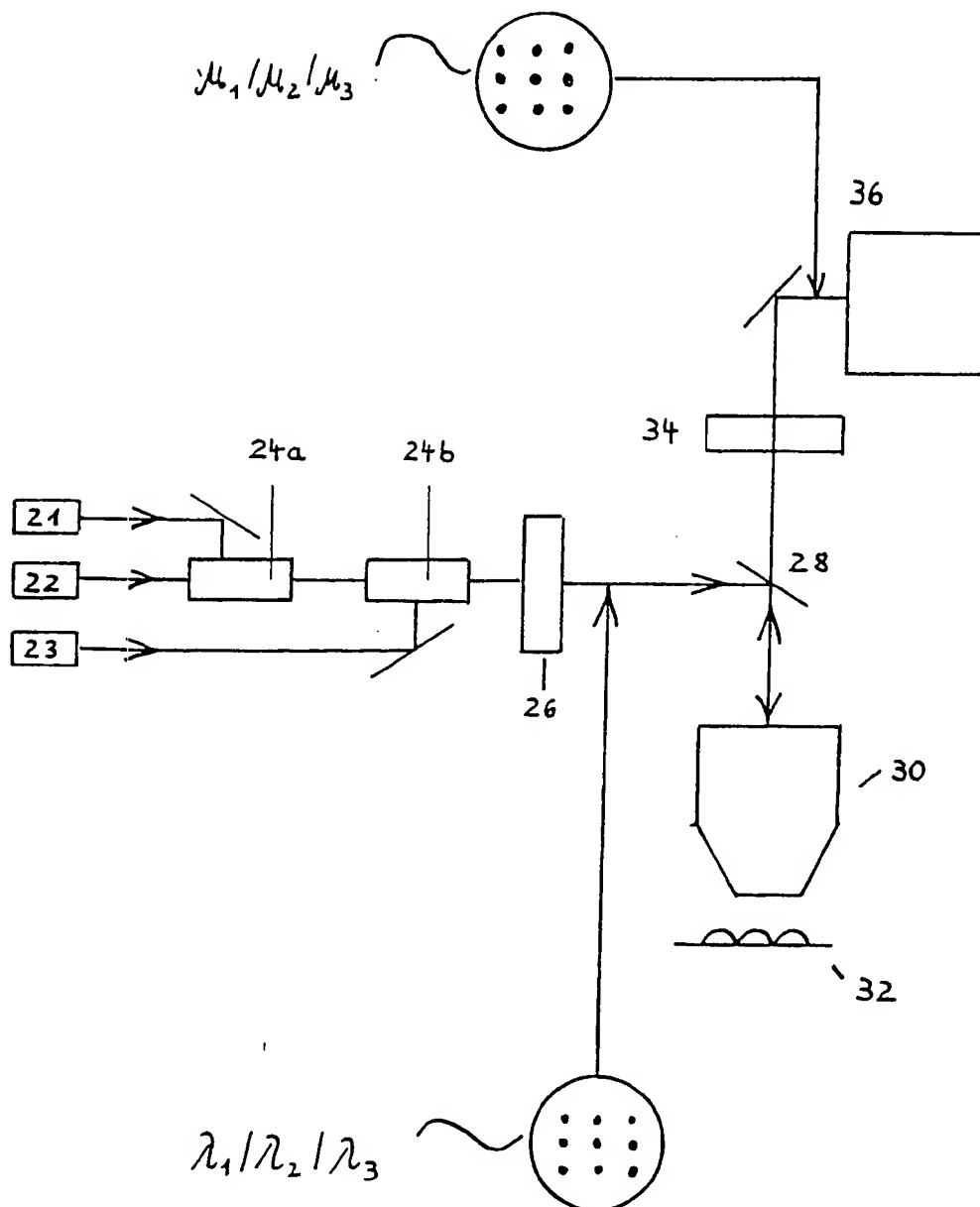
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5

